溶葡球菌酶高效表达与应用研究进展

王曦[1]　　陈熙明[2]　　浦铜良[1*]

(1 兰州大学生命科学学院 兰州 730000　　2 中国科学院西北生态环境研究院 兰州 730000)

摘要 溶葡球菌酶（lysostaphin，Lys）是采用基因克隆技术使溶葡球菌酶基因实现外源表达所产生的蛋白。它是 Zn^{2+}依赖的金属蛋白酶，具有肽链内切酶活性，能专一性地水解葡萄球菌细胞壁 Gly 五肽桥联，使金黄色葡萄球菌（特别是 *MRSA*）细胞壁破裂，达到溶菌杀菌作用，而不产生耐药性。作为一种抗菌剂，在兽药与临床等领域具有巨大的应用潜力。本文综述了溶葡球菌酶的来源、作用机理、不同表达系统及前景与展望。

关键词　溶葡球菌酶　金黄色葡萄球菌　高效表达　应用

Progress on High Efficient Expression and Application of Lysostaphin

WANG Xi[1]　CHEN Xi-ming[2]　PU Tong-liang[1*]

(1 School of Life Sciences,LanZhou University, lanzhou,730000, China)

(2 Northwest Institute of Eco-Environment and Resources, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou, 730000, China)

Abstract Lysostaphin(Lys) is usually exogenously expressed in varieties of cells or organisms with gene cloning technology. Lys is a Zn^{2+} metalloenzyme and a glycylglycinen endopeptidase specific to the pentaglycine cross-bridges of peptidoglycan in the cell walls of Staphylococcus aureus, especially, methicillin-resistant S. aureus（MRSA）, then showing an unique bacteriolytic activities. As a kind of efficient antibacterial agent, it has enormous application potentialities in the fields of veterinary drugs and clinical applications. It was reviewed in this article the origins and lysing mechanism of the Lys, the varieties of exogenously gene expression systems. And the developmental situation and prospects of Lys applications were also discussed.

Key words Lysostaphin　Staphylococcus aureus　Efficient expression　Application

金黄色葡萄球菌是一种对人与动物健康构成严重威胁的病原微生物[1]。20 世纪 40 年代，人们将青霉素投用于临床，治疗由金黄色葡萄球菌所引起的感染。

但是，在 1942 年却发现金黄色葡萄球菌对青霉素产生了耐药性。为了进一步治疗由金黄色葡萄球菌所引起的感染，科学家后续研制出一种新的窄谱抗生素——甲氧西林。然而，在 1960 年即发现部分金黄色葡萄球菌对甲氧西林也产生了耐药性，将该株金黄色葡萄球菌分离并命名为 *MRSA*（*methicillin-resistant S. aureus*）。近年来，以 *MRSA* 为代表的耐药菌在临床上日益盛行，给抗感染治疗带来巨大难题，因此急需寻找抗 *MRSA* 的新药物。

有学者发现，溶葡球菌酶对金黄色葡萄球菌有溶菌效果[2]。溶葡球菌酶是一种相对分子量约为 27000 Dal 的 Zn^{2+}依赖蛋白酶，等电点（PI）是 9.5，最适 PH 为 7.5，具有肽链内切酶活性，专一性地作用于细菌细胞壁肽聚糖的 Gly 五肽桥联[3]，从而使细胞壁破裂，其溶菌活性不受细菌生长周期的影响，对任何细胞时期的金黄色葡萄球菌都有杀灭作用，而且不产生耐药性。研究发现[4-5]，Gly 五肽桥联大多存在于葡萄球菌细胞壁中，而金黄色葡萄球菌细胞壁中含量最多，因此，溶葡球菌酶对金黄色葡萄球菌（尤其是 MRSA）具有很好的溶菌杀菌效果。

近年来，随着基因工程技术的迅速发展，溶葡球菌酶实现了在乳酸杆菌和大肠杆菌等表达系统中高效表达。异源表达的溶葡球菌酶在理化性质和酶活性等方面与天然溶葡球菌酶没有本质区别，相比天然溶葡球菌酶获得途径，异源表达更容易实现[6]。本文对溶葡球菌酶的来源、作用机制、不同表达系统及其应用进行了综述。

1. 溶葡球菌酶

20 世纪 60 年代，Schlndler 与 Schuhardt 从一株模仿葡萄球菌（Staphylococcus simulans）培养物中发现并分离得到溶葡球菌酶[7]。

2. 溶葡球菌酶作用机制

金黄色葡萄球菌是革兰氏阳性菌，肽聚糖是其胞壁的重要组成部分，保持细

胞形态，保护细胞不会渗透性涨破。如图 1，金黄色葡萄球菌肽聚糖是由 N-乙酰葡糖胺与 N-乙酰胞壁酸残基交替组成的，胞壁酸与四肽链（D-丙氨酸、D-谷氨酰胺、L-赖氨酸、D-丙氨酸）连接在一起，而四肽链和甘氨酸五肽桥通过单链赖氨酸残基的ε-氨基连接在一起，而另一边由丙氨酸羧基连接。如图 2，溶葡球菌酶首先合成以 493 个氨基酸构成的前酶原，其由 N 端 36 个氨基酸构成的前导肽指导进入分泌途径，分泌至胞外。前酶原的 N 端有 15 个由 13 个氨基酸构成的重复序列，这些重复序列使溶葡球菌酶前酶源的活性比成熟溶葡球菌酶的活性低 70％。这些重复序列经分泌的半胱氨酸蛋白酶降解之后形成有活性的溶葡球菌酶。成熟的溶葡球菌酶分子是由两部分组成：N 端蛋白酶区域（PD），具有蛋白酶催化活性，C 端细胞壁靶向区域（CWT），CWT 引导溶葡球菌酶结合到金葡菌表面的受体上，作用于金黄色葡萄球菌细胞壁肽聚糖交联结构中的 Gly 五肽桥联，从而使细胞裂解，达到破壁溶菌的效果[8]。

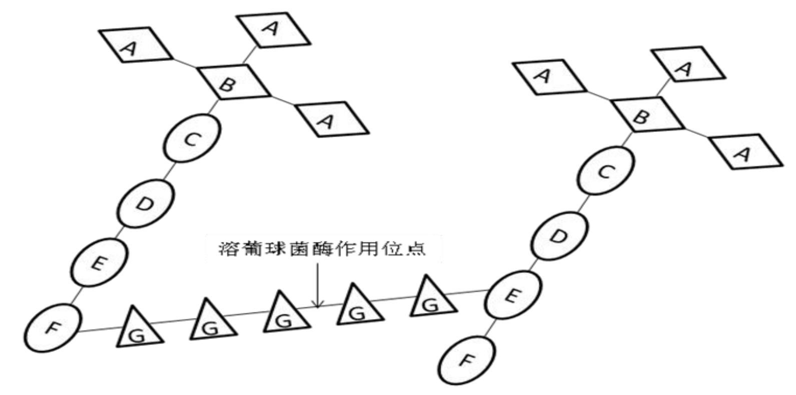


图 1.金黄色葡萄球菌肽聚糖结构和溶葡球菌酶水解位点

Figure1. Staphylococcus aureus peptidoglycan structure and hydrolysis site of lysostaphin.

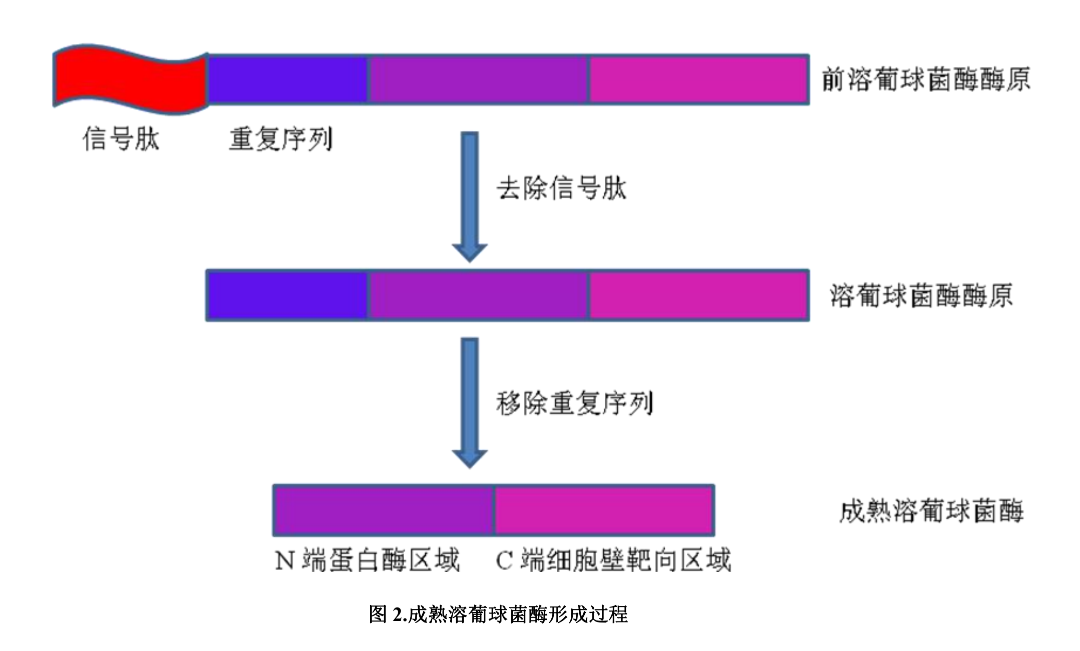


图 2.成熟溶葡球菌酶形成过程

Fig.2 Formative process of mature Lysostaphin

3. 溶葡球菌酶基因异源表达

3.1 原核表达系统

外源基因表达系统中，应用最早的是原核表达系统。原核表达系统是研究的比较成熟的表达系统，主要采用基因克隆技术通过构建表达载体将外源目的基因导入宿主菌的方法，使目的基因在宿主菌中表达出目的产物，其优点在于易于培养操作、繁殖周期短、成本低、基因背景与表达特性清楚。因此，可作为外源基因表达的首选系统[9]。近年来，采用基因工程技术手段构建溶葡球菌酶高产菌株已成为溶葡球菌酶研究的重要态势。目前，溶葡球菌酶基因已实现在大肠杆菌和乳酸杆菌中成功表达（表 1）。

表 1　溶葡球菌酶基因表达系统

Table 1　expression system for lysostaphin gene

表达系统	种类	载体	产量
原核表达系统	大肠杆菌(E.coliJM83)	pET296(+)	—
	大肠杆菌(E.coliJM83)	TOP10F	—
	大肠杆菌(E.coli BL21)	pET23	20 mg/L
	大肠杆菌(E.coli BL21)	pET28a	22 mg/L
	大肠杆菌(E.coli BL21)	pET32a	30 mg/L
	乳酸杆菌（NZ3900）	NICE	300 mg/L
真核表达系统	毕赤酵母（GS115）	pPIC9	500 mg/L
	山羊乳腺细胞	Ad-dl327	10 ug/mL

	Hela 细胞	pcDNA3.1	—
	转基因小鼠乳腺细胞	pcDNA3	1.3mg/ml
	奶牛乳腺细胞	—	14 mg/ml

3.1.1 溶葡球菌酶基因在大肠杆菌中表达

早期实现溶葡球菌酶异源表达是通过大肠杆菌表达系统实现的。Chan 等[10]与 SzwedaP 等[11]将来自葡萄球菌的一段溶葡球菌酶基因导入大肠杆菌质粒中进行异源表达。Chan 将 1.5 Kb 大小的溶葡球菌酶基因插入表达载体 pET296(+)，采用电击法将质粒 pLY202 转化进大肠杆菌（E.coliJM83），通过筛选获得阳性克隆，对其进行摇瓶培养。结果表明：溶葡球菌酶在大肠杆菌中表达的酶活是 11500U/L（活性单位：金黄色葡萄球菌悬浊液 10min 内 A620 减少一半，定义为一个活性单位）。Szweda 等人再次将溶葡球菌酶基因导入大肠杆菌质粒（TOP10F）中，经发酵表达溶葡球菌酶，其活性(约为：26667U/L)相对前者有所提高。针对溶葡球菌酶的产量，很多专家学者为其付出了巨大努力。Szweda P 等[12]与 Zhang BW 等[13]分别构建获得新质粒 pET23Lys 和 pET28a-lys (pET-lys)。质粒 pET23Lys 与 pET28a-lys 分别转化大肠杆菌 *E. coli BL21*(*DE3*)与 *E. coliBL21* (*λDE3*)，于 LB 培养基中培养，用终浓度为 0.1 mM 的 IPTG（异丙基硫代-β-D-半乳糖苷）诱导，最终将发酵液上清纯化，分别获得约 20mg/L 与 22mg/L 的溶葡球菌酶，二者产物表达量差异并不大。为了进一步能在产量上有所突破，Farhangnia L 等[14]将溶葡球菌酶基因克隆入表达载体 pET32a，构建得到新质粒 pET32a-lys (pET-lys)，转化大肠杆菌 BL21 (DE3)，对其采用 IPTG 诱导表达并纯化，得到 30 mg/L 溶葡球菌酶。虽然在不断地优化大肠杆菌表达系统，使溶葡球菌酶的活性增强，产量有所提升，但是，利用大肠杆菌表达系统进行大规模生产还存在诸多问题有待解决，比如，采用大肠杆菌表达的外源蛋白，大部分属于胞内表达，增大了蛋白纯

化的难度；目的产物的表达量较低；表达菌株的不稳定性；表达蛋白错误折叠等，所以此项技术还有待进一步提高。

3.1.2 溶葡球菌酶基因在乳酸杆菌中表达

相对大肠杆菌而言，乳酸杆菌是原核表达系统中应用较多的另一类表达系统。其中大肠表达系统表达的蛋白大部分属于胞内表达，使下游纯化工作变的尤为困难。而乳酸杆菌新陈代谢途径简单清楚，基因背景已知，因此可作为首选的异源表达系统[15]。Mierau I 等[16]将溶葡球菌酶基因导入由乳酸链球菌素控制的基因表达载体—NICE（pNZ8148），构建得到新质粒(pNZ1709)，在构建过程中由于氯霉素抗性基因与 lacF 基因发生交换，对此命名为 pNZ1710，用其转化乳酸杆菌 NZ3900（pNZ1710），用 10 ng/mL 的乳酸链球菌素进行诱导表达，发现溶葡球菌酶在细胞质中表达量为 100 mg/L。同年 Mierau I 等[17]用同样的方法将溶葡球菌酶基因在乳酸杆菌中表达，通过调节发酵条件（PH、温度、乳酸链球菌素的添加量），使溶葡球菌酶产量由 100 mg/L 上升到 300 mg/L。尽管原核表达相关技术目前已非常成熟，能够在较短的时间内得到目的产物，但是，仍然存在很多难以克服的困难，比如，溶葡球菌酶很多以包涵体的形式出现,即宿主菌表达的目的蛋白在胞内相互聚集形成低活性的固体颗粒，属于细胞内不溶性表达，致使产物纯化难度增大；另外，原核表达系统翻译后加工修饰功能不够完善 ,比如，表达的目的蛋白，部分肽链在折叠过程中出现特异性错误聚合，致使形成完全解链或者未成熟的蛋白，致使目的产物活性较低。

3.2 真核表达系统

相较于原核表达系统，真核表达系统的翻译后修饰功能更加完善。比如，mRNA 在经过核糖体与内质网后形成的蛋白不具活性，在一系列的加工后（二硫键的形成、糖基化、信号序列的加工等），表达的外源蛋白更接近原始天然蛋白

质。目前，在基因工程研究中最常用的真核表达系统主要有酵母菌和哺乳动物细胞，溶葡球菌酶基因已实现在毕赤酵母、山羊乳腺细胞、hela 细胞、转基因小鼠乳腺细胞、奶牛乳腺细胞中成功表达（表 1）。所以，采用真核表达系统表达目的蛋白越来越受到人们的重视[18]。

3.2.1 溶葡球菌酶基因在毕赤酵母中表达

毕赤酵母（*Pichia Pastoris*）是近年来高效表达外源蛋白使用较多的宿主菌，有超过 1000 种外源蛋白已实现成功表达。毕赤酵母表达系统具备较完善的表达调控机理及对表达产物具有修饰功能，表达过程中不会产生内毒素，有利于蛋白表达。因此，毕赤酵母也是目前应用最多、最广泛的表达系统之一，具有良好的应用前景[19-20]。Zhao HL 等[21]将溶葡球菌酶基因克隆入毕赤酵母表达载体（pPIC9），电转化毕赤酵母菌株（GS115），后期采用甲醇诱导表达，通过摇瓶培养获得 80mg/L 的溶葡球菌酶。之后为了评估毕赤酵母对溶葡球菌酶中试产品生产的潜能，将毕赤酵母作为宿主，对溶葡球菌酶基因及序列做了相关优化，通过 2L 发酵培养，得到 500 mg/L 溶葡球菌酶。这个产量是目前溶葡球菌酶在毕赤酵母菌中表达得到的最高产量。SchottePeter 等[22]研究发现，毕赤酵母甲醇利用快型菌株的甲硫氨酸残基发生 O-甲基 L-高丝氨酸错配，降低了氧和甲醇的需求量，能够进一步提高重组蛋白的表达水平。目前，毕赤酵母在发酵过程中仍存在的问题是：需高溶氧，高甲醇，甲醇易燃有安全隐患，同时发酵周期较长等。总体而言，相较于原核表达系统，毕赤酵母表达系统表达的溶葡球菌酶表达水平大幅提高。

3.2.2 溶葡球菌酶基因在山羊乳腺细胞中表达

将溶葡球菌酶基因导入山羊乳腺细胞中，乳腺细胞分泌的溶葡球菌酶对山羊乳房炎有治疗效果。Fan W 等[23]将含有溶葡球菌酶基因的腺病毒载体导入处于非

哺乳期的山羊右乳房，同时将含有大肠杆菌 lacZ 基因的腺病毒导入同一山羊的左乳房作为对照，发现山羊的右乳腺分泌物中有 10 ug/mL 的溶葡球菌酶产生，说明分泌的溶葡球菌酶对山羊的乳房炎起到了一定的治疗作用，但是山羊乳腺中溶葡球菌酶的表达量很低，同时免疫系统对表达载体以及溶葡球菌酶有免疫反应，致使治疗效果不理想。Huang CY 等[24]人针对山羊乳腺细胞中表达的溶葡球菌酶生物活性比较低做了进一步研究。通过对溶葡球菌酶基因进行点突变，结果发现溶葡球菌酶 N 端第 125 位天冬酰胺（Asn）糖基化导致溶葡球菌酶的酶活较低，此项研究提高了山羊乳腺细胞分泌的溶葡球菌酶活性。目前而言，形成一种能够避免对治疗蛋白本身做出免疫响应的方法仍具有很大的挑战性。

3.2.3 溶葡球菌酶在 hela 细胞中表达

目前，溶葡球菌酶在 hela 细胞中表达鲜有报道。Klein M 等[25]在溶葡球菌酶基因的 C 端加上 His 标签，作为筛选标记。将溶葡球菌酶基因插入哺乳动物表达载体（pcDNA3.1）中，构建得到组成型表达载体（pcDNA-lys），用 pcDNA-lys 转化 hela 细胞，48h 后用免疫印迹法检测到 hela 细胞中有溶葡球菌酶积累。用 hela 细胞做固体金黄色葡萄球菌抑菌实验，发现有较大抑菌圈出现。首先，说明表达的溶葡球菌酶有活性，其次说明溶葡球菌酶在 hela 细胞中以两种方式表达，即胞内表达和胞外分泌表达。综上所述，利用 hela 细胞表达溶葡球菌酶，在产量上可能有很大突破，这主要取决于 hela 细胞的自身特性，比如：细胞株自身不会衰老死亡，可无限分裂繁殖，并且增殖速度异常快，所以利用 hela 细胞表达溶葡球菌酶未来有很大的发展前景。

3.2.4 溶葡球菌酶基因在转基因小鼠乳腺细胞中表达

Kerr DE 等[26]将成熟的溶葡球菌酶基因导入真核表达载体（pcDNA3）获得新质粒（pCMV-Lys），同时将人生长激素（hGH）编码序列作为信号肽插入质

粒（pCMV-Lys）中，构建得到质粒（pSec-Lys），将其导入转基因小鼠乳腺细胞中，发现在小鼠乳腺细胞中有溶葡球菌酶表达，但此酶无活性。为了恢复溶葡球菌酶的活性，对溶葡球菌酶基因做了进一步改造，将 125 与 232 位的 Asn（天冬酰胺）转换成 Gln（谷氨酰胺），得到改造载体（Sec-Gln125,232-Lys），将其导入转基因小鼠乳腺细胞，最终在小鼠乳汁中获得 1.3 mg/ml 的溶葡球菌酶，发现表达的溶葡球菌酶对转基因小鼠的乳房炎具有治疗作用。溶葡球菌酶基因在转基因小鼠乳腺细胞中成功表达，为未来溶葡球菌酶作为一种兽药应用奠定了基础。

3.2.5 溶葡球菌酶基因在奶牛乳腺细胞中表达

由金黄色葡萄球菌引起的奶牛乳腺炎已占到奶牛乳房疾病的 30%，抗生素治疗率低于 15%，事实证明其治疗难度较大。奶牛乳腺炎是奶牛较常见的疾病，对奶牛业生产构成极大的威胁。此种疾病会使奶牛乳房发炎肿胀，产奶量大幅下降。Wall RJ 等[27]将溶葡球菌酶基因导入奶牛乳腺细胞中，使乳腺细胞分泌表达溶葡球菌酶，使溶葡球菌酶分泌于牛奶中，结果表明：牛奶中溶葡球菌酶的量达到了 0.9 至 14 mg/ml，而牛奶中溶葡球菌酶的量只需 3mg/ml 就可治愈由金黄色葡萄球菌引起的奶牛乳腺炎。此方法对奶牛乳腺炎的治疗相比抗生素治疗效果更持久，更安全，不会出现耐药性。所以，此项研究为未来奶牛乳腺炎的治疗具有指导作用。

4. 溶葡球菌酶应用

本文将溶葡球菌酶应用分为三部分：兽药应用、临床应用和其他应用（表 2）。

表 2 溶葡球菌应用

Table 2 The application of Lysostaphin

类型	实例
兽药应用	治疗小鼠乳腺炎 治疗奶牛子宫内膜炎 治疗奶牛乳房炎
临床应用	治疗人皮肤烧伤创面 MRSA 感染

	治疗人鼻腔金黄色葡萄球菌感染
其他应用	抗流感病毒 治疗小鼠血液 MRSA 感染 治疗人血清 MRSA 感染

4.1 兽药应用

4.1.1 治疗小鼠乳腺炎

利凯等[28]研究了溶葡球菌酶对小鼠乳腺炎的治疗效果,发现溶葡球菌酶能有效减少金黄色葡萄球菌感染，采取乳头灌注的方式给药，实验结果显示：溶葡萄球菌酶能有效降低金黄色葡萄球菌感染, 减少组织损伤,消除炎症，对革兰氏阳性菌引起的小鼠乳腺炎治疗效果明显。但是有学者研究表明，将溶葡萄球菌酶与部分裂解酶、阳离子抗菌肽和抗生素协同作用能够更有效治疗小鼠乳房炎。比如，Schmelcher M 等[29]分别用溶葡球菌酶和噬菌体 K 细胞内溶素作用于患病小鼠乳腺，溶葡球菌酶和噬菌体 K 细胞内溶素对金葡菌 CFU 分别仅降低了 0.63、0.81 个对数单位。但是将二者结合起来作用于患病区，降低的金黄色葡萄球菌 CFU 是溶葡球菌酶与噬菌体 K 细胞内溶素分别作用的 5.3 倍与 4.1 倍。说明溶葡球菌酶和噬菌体 K 细胞内溶素协同作用治疗金黄色葡萄球菌引起的小鼠乳腺炎疗效更佳。因此，将溶葡萄球菌酶与部分裂解酶、阳离子抗菌肽和抗生素联合使用治疗小鼠乳腺炎会有更好的疗效。

4.1.2 治疗奶牛子宫内膜炎

奶牛子宫内膜炎主要是生产或产后初期由病原菌引起的子宫内膜感染所形成的繁殖性障碍疾病，发病率较高，经常造成奶牛屡配不孕、长期不孕致使淘汰，对奶牛生产造成严重影响。张继恩等[30]采取奶牛子宫内灌注给药的方法研究溶葡萄球菌酶对奶牛子宫内膜炎的疗效。结果显示溶葡球菌酶对奶牛子宫内膜炎具有很好的疗效。袁怀兵等[31]采用和张继恩同样的给药方式，治疗奶牛急慢性子宫内膜炎，结果表明其疗效比抗生素治疗提高了 13％，说明溶葡球菌酶治疗奶牛子宫

内膜炎疗效显著，且明显优于抗生素治疗。关于溶葡球菌酶在治疗奶牛子宫内膜炎的同时是否存在溶葡球菌酶在奶牛体内与牛奶中残留，以及是否影响牛奶质量相关问题，陆锦春等[32]做了相关研究。作者采用子宫灌注的方式，给健康与患病的奶牛注入不同浓度的溶葡萄球菌酶后，在血液和牛奶中没有发现溶葡球菌酶积累，说明溶葡球菌酶在治疗奶牛子宫内膜炎的同时，对奶牛健康和奶质是安全的。

4.1.3 治疗奶牛乳房炎

奶牛乳房炎是直接导致奶牛产奶量急剧下降的关键因素之一，牛奶质量下降，会导致奶牛过早淘汰，对奶牛业造成巨大损失。抗生素治疗乳房炎效果不理想，并且容易导致耐药菌出现及抗生素残留。目前我国正处于奶牛业快速发展时期，相关技术和设施不够完善，因此，乳房炎造成的损失十分严重，阻碍了我国奶牛业的发展。因此，研发一种安全有效的防治奶牛乳房炎的新药物（溶葡球菌酶）非常必要。蒋司嘉等[33]采用重组溶葡萄球菌酶三个剂量，采用乳池灌注给药的方式作用于患有乳房炎的乳区，对奶牛乳房炎治愈率分别为75.0%、83.3%、91.7%，说明溶葡球菌对奶牛乳房炎的疗效十分显著。关文怡等[34]就溶葡球菌酶对奶牛隐性乳房炎的治疗做了相关研究，结果显示溶葡球菌酶对奶牛隐性乳房炎的治疗是安全有效的。Hoernig K J 等[35]研究发现，单一溶葡球菌酶治疗奶牛隐性乳房炎的疗效比复合溶葡球菌酶的疗效好。溶葡球菌酶在治疗奶牛乳房炎的过程中，能够解决传统抗生素治疗过程中出现的耐药性和牛奶中高残留问题，有利于提高牛奶的产量及品质，降低奶牛乳房炎对养殖产业造成的损失。

4.2 临床应用

4.2.1 对人皮肤烧伤创面 MRSA 感染治疗

MRSA 自发现以来，其感染范围不断扩大，现已成为重要的致病菌之一[36]。在烧伤创面感染中，创面一经发现感染，便会出现化脓、溃烂，其中 MRSA 感

染占较大比例，极大地增加了治疗难度。杨雄等[37]对 67 位病人的烧伤创面用复合溶葡球菌酶制剂进行处理，结果发现患者烧伤创面感染均得到有效控制。聂学等[38]对 32 例感染 MRSA 的烧伤患者采用复合溶葡球菌酶治疗，持续一个疗程后，大部分创面愈合，表明复合溶葡球菌酶能有效治疗烧伤后期 MRSA 感染，而且对病人无免疫反应。烧伤创面 MRSA 感染一直以来是临床治疗的一大难题，溶葡球菌酶弥补了抗生素治疗的缺陷，为患者治疗带来了福音。

4.2.2 对人鼻腔携带金黄色葡萄球菌感染治疗

有报道显示，溶葡球菌酶对人鼻腔携带的金黄色葡萄球菌有清除效果。20 世纪 70 年代 QUICKEL K E.等[40]采用溶葡球菌酶喷鼻剂局部治疗鼻腔金黄色葡萄球菌感染，分别在治疗第 5 天与第 11 天对治疗区域与对照区域进行活菌计数，结果发现溶葡球菌酶的治愈率达到了 91%，由此可见，溶葡萄球菌酶治疗鼻腔金黄色葡萄球菌感染效果良好。

4.3 其他应用

施强等[41]采用以溶葡球菌酶与溶菌酶为主要成分的溶葡球菌复合酶对体外抗流感病毒做了相关研究。发现溶葡球菌复合酶对抗流感病毒疗效明显，表明其可作为一种有效的抗流感药物。Kokaikun JF 等[42]对血液与器官感染 *MRSA* 的小鼠采用静脉注射的方式将溶葡球菌酶作用于患病小鼠，发现溶葡球菌酶可清除小鼠血液与器官中感染的 *MRSA*。同时，将溶葡球菌酶与青霉素或万古霉素组合，能够进一步提高对 *MRSA* 的治疗效果。Oluola O 等[43]研究发现溶葡球菌酶对刚出生的感染 *MRSA* 的小鼠具有明显的治疗作用。此外，Desbois A P 等[44]研究发现溶葡球菌酶与抗菌肽钙联蛋白协同作用对人血清中感染的 *MRSA* 具有清除作用。因此，可以预见溶葡球菌酶会有更好的应用潜力。

5．前景与展望

近年来，由于抗生素的大量使用，多种耐药菌的出现使许多疾病的治疗难度增大。以 *MRSA* 为例，治疗由 *MRSA* 引起的各种感染极为困难。溶葡球菌酶对 *MRSA* 有很好的治疗作用，并且不产生耐药性，在动物体内无残留，对正常组织无刺激、无致突变性，安全有效。因此，对溶葡球菌酶的研究备受人们的关注，使其再次成为研究的新热点。随着基因工程技术的迅速发展，通过不同表达系统将溶葡球菌酶基因进行外源表达，此项技术将在医药以及工业生产中变的尤为重要。目前，溶葡球菌酶只完成Ⅰ和Ⅱ期临床试验，以现在的研究水平，要实现溶葡球菌酶产业化，还有很长的路要走。随着现代科学技术的迅速发展，可以预见，溶葡球菌酶具有广阔的应用前景。

致谢 感谢我的导师浦铜良老师和中国科学院西北生态环境研究院陈熙明老师的悉心指导和帮助。

参考文献

[1]Szweda P, SchielmannM, Kotlowski R,et al.Peptidoglycan hydrolases-potential weapons against Staphylococcus aureus. Appl Microbiol Biotechnol , 2012, 96(5):1157–1174.

[2]Wu JA, Kusuma C, Mond JJ, et al. Lysostaphin Disrupts Staphylococcus aureus and Staphylococcusepid ermidis Biofilms on Artificial Surfaces. Antimicrobial Agents and Chemotherapy,2003,47(11):3407-341 4.

[3]Schmelcher M, Donovan DM , Loessner MJ. Bacteriophage endolysins as novelantimicrobials. Future Microbiol, 2012,7(10):1147–1171.

[4] Michael WC, Kerstin E. Gordon LA. Mechanism and Suppression ofLysostaphin Resistance in Oxacilli n-Resistant Staphylococcus aureus.Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(5):1431-1437.

[5]王永,刘沐荣,万海同,等.聚乙二醇修饰重组溶葡球菌酶的初步研究.中国生物工程杂志,2013,33(6):12-17. Wang Y, Liu MR,Wan HT, et al.chemical modification of Lysostaphin with activated polyethlene glycol. China Biotechnology, 2013,33(6):12-17.

[6]García-Cano I, Campos-Gómez M, Contreras-Cruz M ,et al.Expression, purification, and characterization of a bifunctional 99-kDa peptidoglycan hydrolase from Pediococcus acidilactici ATCC 8042. Appl Microbiol Biotechnol ,2015, 99(20):8563–8573.

[7] Schindler CA,Schuhardt VT. Lysostaphin: A new bacteriolytic agent for the staphylococcus. Proc Natl Acad Sci USA, 1964,51(3):414-421.

[8]Freire Bastos MC, Coutinho BG, Coelho ML et al. Lysostaphin: A Staphylococcal Bacteriolysin with Potential Clinical Applications. Pharmaceuticals, 2010, 3(4):1139-1161.

[9]郭广君,吕素芳,王荣富.外源基因表达系统的研究进展.科学技术与工程,2006,6(5):1671-1678.

Guo GJ,Lu SF,Wang RF. Progress on the Expression System of Heterologous Gene.Science Technology and Engineering, 2006,6(5):1671-1678.

[10]Chan EC. Expression and Purification of Recombinant Lysostaphin in Escherichia coil. Biotechnology Lettters,1996,18(17) :833-838.

[11]Szweda P,Gorczyca G, Filipkowski P,et al.Eficient Production of Staphylococcus simulans Lysostaphin in Benchtop Bioreactor by Recombinant Escherichia coli.Preparative Biochemistry and Biotechnology,2014,44(4):370-381.

[12]Szweda P, Kotłowski R, Kur J. Neweffective sources of the Staphylococcus simulans lysostaphin. Journal of Biotechnology,2005,117(2):203-213.

[13]Zhang BW, Tao SG, Ma HM ,et al. Lysis of mastitis pathogens isolated from dairy cow milk samples by purified recombinant lysostaphin.African Journal of Biotechnology,2012,11(20): 4649-4659.

[14]Farhangnia L, Ghaznavi-Rad E, Mollaee N, et al. Cloning, Expression, and Purification of Recombinant Lysostaphin From Staphylococcus simulans. Jundishapur J Microbiol,2014,7(5): e10009.

[15]Morello E,Bermúdez-Humarán LG, Llull D, et al.Lactococcus lactis, an Efficient Cell Factory for Recombinant Protein Productionand Secretion. Journal of Molecular Microbiology Biotechnology,2008,14(1-3):48–58.

[16]Mierau I, Leij P, Swam IV, Blommestein B, et al.Industrial-scale production and purification of a heterologous protein in Lactococcus lactis using the nisin-controlled gene expression system NICE: The case of lysostaphin.Microbial Cell Factories ,2005, 4(1):1-9.

[17]Mierau I, Olieman K, Mond J, et al.Optimization of the Lactococcus lactis nisin-controlled gene expression system NICE for industrial applications. Microbial Cell Factories ,2005, 4(1):1-12.

[18]Müller D, Bayer K, Mattanovich D. Potentials and limitations of prokaryotic and eukaryotic expression systems for recombinant protein production – a comparative view. Microbial Cell Factories,2006, 61(1):260-262.

[19]刘晓明,姜宁,张爱忠,等.杂合抗菌肽在毕赤酵母中的表达及其活性测定.中国生物工程杂志,2016,36(2):81-89.

Liu XM, Jiang N, Zhang ZA, et al. Expression of Hybird Antibacterial Peptides in Pichia yeast and Identification of Its Biological Activity. China Biotechnology, 2016,36(2):81-89.

[20]傅小蒙,孔令聪,裴志,等.毕赤酵母表达系统优化策略概述.中国生物工程杂志,2015,35(10):86-90.

Fu XM,Kong LC,Pei Z, et al. Advance in the Research of Antimicrobial Peptides Gene Expression in Pichia pastor. China Biotechnology, 2015,35(10):86-90.

[21] Zhao HL, Blazanovic K, Choi Y, et al. Gene and Protein Sequence Optimization for High-Level Production of Fully Active and Aglycosylated Lysostaphin in Pichia pastoris. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(9): 2746–2753.

[22] Schotte P, Dewerte I, Groeve MD, et al. Pichia pastoris MutS strains are prone to misincorporation of O-methyl-l-homoserine at methionine residues when methanol is used as the sole carbon source. Microbial Cell Factories, 2016,15(1):1-9.

[23] Fan W, Plaut K, Bramley AJ, et al. Persistency of Adenoviral-Mediated Lysostaphin Expression in Goat Mammary Glands. American Dairy Science Association, 2004, 87(3):602–608.

[24] Huang CY, Hsu JT,Chung PH, et al. Site-Specific N-Glycosylation of Caprine Lysostaphin Restricts its Bacteriolytic Activity toward Staphylococcus Aureus. Animal Biotechnology, 2013,24(2):129-147.

[25] Klein M, Kro¨nke M, Krut O. Expression of lysostaphin in HeLa cells protects from host cell killing by intracellular Staphylococcus aureus. Medical Microbiology and Immunology ,2006,195(3): 159–163.

[26] Kerr DE, Plaut K, Bramley AJ et al. Lysostaphin expression in mammary glands confers protection against

staphylococcal infection in transgenic mice. Nature Biotechnology,2001,19(1):66-70.
[27] Wall RJ, Powell AM, Paape MJ , et al. Genetically enhanced cows resist intramammary Staphylococcus aureus infection.2005,23(4):445-451.
[28]利凯,马利芹,徐彤,等.重组溶葡萄球菌酶对金葡菌诱导实验性小鼠乳腺炎的防治研究.京津冀畜牧兽医科技创新交流会暨新思想、新观点、新方法论坛论文集.河北保定:2008,2519–2522.
Li K,Ma LQ,Xu T, et al. The Study of Recombinant Lysostaphin on the Prevention and Treatment of Experimental Mastitis in Mice Induced by Staphylococcus aureus. Proceedings of Beijing, Tianjin and Hebei animal husbandry and veterinary science and technology innovation exchange cum collection of new ideas, new ideas, new methods forum.Hebei Baoding:2008, 2519–2522.
[29] Schmelcher M, Powell AM, Becker SC, et al. Chimeric Phage Lysins Act Synergistically with Lysostaphin To Kill Mastitis-Causing Staphylococcusaureus in Murine Mammary Glands. Applied and Environmental Microbiology ,2012,78(7):2297–2305.
[30]张继恩,吴聪明,孙永学,等.重组溶葡萄球菌酶对奶牛子宫内膜炎的疗效研究.首届中国兽药大会暨中国畜牧兽医学会动物药品学分会 2008 年学术年会论文集.天津：2008,17-23.
Zhang JE,Wu CM,Sun YX, et al.The Study of Recombinant Lysostaphin on Treatment Trial of Endometritis in Dairy Cattle. Proceedings of the first Chinese veterinary drug assembly animal and drug eessays proceedings of the 2008 annual conference of animal and veterinary medicine of China animal and veterinary society. Tianjin:2008,17-23.
[31] 袁怀兵.重组溶葡萄球菌酶对奶牛子宫内膜炎的疗效研究.当代畜禽养殖业,2013,12(19):6-7.
Yuan HB. The Study of Recombinant Lysostaphin on Treatment Trial of Endometritis in Dairy Cattle. Modern Animal Husbandry, 2013,12(19):6-7.
[32]陆锦春,陈华鹏,马怀彦,等.重组溶葡萄球菌酶在患子宫内膜炎奶牛体内的药代动力学与残留研究.疾病防治,2012,(2):40-44.
Lu JC,Chen HP,Ma HY, et al. Pharmacokinetics and residue of recombinant lysostaphin in dairy cows with endometritis. Disease Prevention, 2012, (2):40-44.
[33]蒋司嘉,张继恩,吴聪明,等.重组溶葡萄球菌酶对奶牛乳房炎的疗效研究.中国兽药杂志,2011,45(12) : 23-28.
Jiang SJ,Zhang JE,Wu CM, et al. Therapeutic Efficacy of Recombinant Lysostaphin on Bovine Mastitis. China Journal of Veterinary Medicine, 2011,45(12): 23-28.
[34]关文怡,李桂伶,郭海龙.重组溶葡萄球菌酶对奶牛隐性乳房炎的治疗试验.山东畜牧兽医,2014,18(9):13-14.
Guan WY,Li JL,Guo HL. Effect of recombinant lysostaphin on subclinical mastitis in dairy cows. Shangdong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2014,18(9):13-14.
[35] Hoernig KJ, Donovan DM, Pithua P, et al. Evaluation of a lysostaphin-fusion protein as a dry-cow therapy for Staphylococcus aureus mastitis in dairy cattle. American Dairy Science Association, 2016, 99(6):4638–4646.
[35]杨雄,刘凤彬,刘洋.溶葡萄球菌酶对控制烧伤创面 MRSA 感染的临床观察.中国实用医药,2010,5(18):95-96.
Yang X,Liu FB,Liu Y.clinical observation of lysostaphin Treatment of Burn Wounds MRSA Infection. China practical medicine, 2010,5(18):95-96.
[36]Orlin I, Rokney A, Onn A, et al. Hospital clones of methicillin-resistant Staphylococcus aureus are carried by medical students even before healthcare exposure. Antimicrobial Resistance & Infection Control, 2017, 6(1):15.
[37] 聂学,李文生,杨文元.复合溶葡萄球菌酶治疗烧伤后期感染创面的疗效观察.中国实用医药,2011,6(3):157-158.
Nie X,Li WS,Yang WY. Curative effect of compound Lysostaphin cures burn wound infection in the late stage. China practical medicine. 2011,6(3):157-158.
[38] Fischer GW. ULTRA-LOW DOSE LYSOSTAPHIN FOR TREATING MRSA. WO/2015/100447[P]. 2015.

[39] 施强,居丽雯,朱献忠,等.溶葡萄球菌复合酶体外抗流感病毒效果研究.中国卫生检验杂志 ,2006,16(12):1439-1442.

Shi Q,Ju LW,Zhu XZ ,et al. Effect of compound Lysostaphin on influenza virus in vitro. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2006,16(12):1439-1442.

[40] Kokaikun JF. Lysostaphin as a treatment for systemic Staphylococcus aureus infection in a mouse model. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007, 60(5):1051-1059.

[41] Oluola O, Kong L, Fein M, et al. Lysostaphin in Treatment of Neonatal Staphylococcus aureus Infection. Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 2007, 51(6):2198-2200.

[42] Desbois AP, Gemmell CG, Coote PJ. In vivo efficacy of the antimicrobial peptide ranalexin in combination with the endopeptidase lysostaphin against wound and systemic meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infections. International Journal of Antimicrobial Agents,2010,35(6):559-565.